

УДК 665.7.038: 579.26.003.12 (045)

С.В. Бойченко, канд. техн. наук
Н.М. Кучма**МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ НАФТОПРОДУКТІВ**

Інститут екології та дизайну НАУ, e-mail: test@nau.edu.ua

Наведено методи оцінки біологічного ураження палив, які можна класифікувати двома групами: довготривалі й експрес-методи. Показано, що домінуючими методами оцінки біологічного враження є довготривалі, основні недоліки яких – складність і трудомісткість. Розглянуто експрес-визначення біологічного забруднення авіаційних палив і методи виявлення і попередження біологічного забруднення нафтопродуктів. Запропоновано оперативну ефективну методику тестування авіаційних палив на біологічне враження.

Вступ

На сьогодні відомі різні види втрат нафтопродуктів [1]. На нашу думку, біологічне враження можна віднести до якісно-кількісних втрат.

Постановка завдання

Метою даної статті є аналіз, систематизація і класифікація методів оцінки біологічного враження нафтопродуктів.

Розв'язання проблеми

Нафтопродукти можуть бути забруднені різними мікроорганізмами при зберіганні, транспортуванні і безпосередньому використанні.

Особливо нестійкі до мікроорганізмів палива для повітряно-реактивних двигунів.

Забрудненість нафтопродуктів мікроорганізмами залежить, у першу чергу, від технологічного рівня культури їх використання. Наприклад, постійне використання забрудненого палива може призвести до серйозних наслідків.

Розростаюча біомаса забиває фільтри, паливопроводу, внаслідок чого відбувається розрідження палива і змашувальних матеріалів, корозія металу, що може стати причиною аварій [2].

Отже, дуже важливо завчасно виявити біологічне забруднення палив, а також попередити його розповсюдження.

У даний момент немає загальноприйнятого способу визначення забрудненості палив мікроорганізмами. Ступінь біологічного враження палив можна встановити за інтенсивністю зростання мікроорганізмів, що окиснюють вуглеводні у водно-паливному середовищі [2]. Методи, що застосовуються, основані або на підрахунку загальної кількості і життєздатності мікроорганізмів у різних нафтопродуктах, або на спостереженнях у лабораторних умовах за їх розвитком у поживних середовищах з додаванням нафтопродукту. Ні той, ні той спосіб не дають досить повного уявлення про ступінь ураження нафтопродуктів.

Будь-який метод визначення враження нафтопродукту потребує, крім підбору активних культур мікроорганізмів і умов дослідження, просто, надійного і швидкого способу виявлення мікроорганізмів, оцінки їх чисельності або інтенсивності зростання в системах з паливом. Зазвичай інтенсивність зростання в поживних середовищах і кількість мікроорганізмів у будь-якому субстраті визначають за кількістю клітин або біомасою в одиниці об'єму.

Кількість мікроорганізмів в одиниці об'єму можна визначити або безпосереднім підрахунком клітин під мікроскопом, або за їх зростанням на густих чи рідких поживних середовищах. Крім того, про ступінь зростання мікроорганізмів можна свідчити за результатами підрахунку їх біомаси ваговим або деякими хімічними методами.

Концентрацію бактеріальних клітин у рідких середовищах встановлюють також шляхом порівняння каламутності досліджуваної суспензії з рядом стандартних еталонів, що містять заздалегідь відому кількість клітин. Вибір того або того методу визначається особливостями досліджуваних мікроорганізмів: характером зростання, розмірами клітин, густиною суспензії, а також властивостями субстрату.

У системах з паливами підрахунок мікроорганізмів проводять тими самими методами, що і на середовищах зі сумішшю рідких вуглеводнів. Як правило, тут потрібно враховувати кількість біомаси, що утворилася, або кількість клітин мікроорганізмів, але це важко здійснити через наявність двох фаз у середовищі (мікроорганізми розподіляються не тільки у водній, але й частково у вуглеводневій фазі).

Тому для підрахунку кількості клітин (кількості біомаси) підходять не всі з вказаних методів. А ті методи, які можуть бути використані, як правило, потребують проведення додаткових операцій, пов'язаних з відділенням клітин від вуглеводнів.

Метод безпосереднього підрахунку кількості клітин під мікроскопом для визначення чисельності мікроорганізмів у середовищах з рідкими вуглеводнями або нафтопродуктами використовується дуже рідко, насамперед, через наявність емульсії і нерівномірного розподілу клітин у культуральному середовищі.

Метод обліку мікроорганізмів на фіксованих пофарбованих мазках також малоприматний для культур, що ростуть на середовищах з вуглеводнями, оскільки емульсія не розподіляється рівномірно по предметному склу і приготувати препарат строго визначеної площі не завжди можливо. Однак, якщо водний шар досить великий і паливо не перемішується, цей метод може бути використаний для визначення кількості бактерій у водному шарі [3].

Метод фільтрації через мембранні фільтри з наступним фарбуванням клітин на фільтрі і підрахунком їх кількості під мікроскопом виявився досить зручним для обліку мікроорганізмів, які містяться в нафті. Цей метод може бути використаний для визначення кількості мікроорганізмів у водно-паливному середовищі, однак він не може бути застосований при високих густинах суспензій.

Методи безпосереднього підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом дають можливість найбільш точно визначити кількість мікроорганізмів у субстраті, але не дозволяють розмежувати живі і мертві мікроорганізми. Але важливо у системах з паливами знати кількість життєздатних мікроорганізмів. Тому, досліджуючи палива і водні подушки, часто використовують метод висіву мікроорганізмів на густі середовища, що дозволяє не тільки визначити кількість живих клітин у субстраті, але й оцінити різноманітність мікроорганізмів за морфологією колоній. У більшості випадків для цього застосовують різні за складом поживні середовища, що дає можливість виявити більш широкий спектр мікроорганізмів, які належать до різних фізіологічних груп.

Висів мікроорганізмів на різні середовища був використаний, наприклад, при дослідженні мікрофлори водних подушок з резервуарів з реактивним і дизельним паливами, що знаходились на тривалому збереженні в умовах субтропічного клімату [3].

Стерильно відібрані проби водного шару після ряду розведень висівали на м'ясопептонний агар (МПА), сушений агар (СА) і на мінеральне середовище з сахарозою (середовище Чапека). Застосування цих середовищ дозволило встановити, що серед виділених бактерій найбільшу

частину складають представники родів *Mycobacterium* і *Pseudomonas*, із грибів – *Cladosporium* і *Apergillius*.

Однак не всі мікроорганізми, що виділяються на звичайних середовищах із систем з паливом, розвиваються саме за рахунок палива. Значна частина мікроорганізмів, що виявлені у водних подушках, зростає, використовуючи продукти життєдіяльності вуглеводнеокиснювальних бактерій і грибів. Тому для визначення первинної мікрофлори, що розвивається за рахунок палива, необхідно перевіряти виділені мікроорганізми на здатність до зростання в середовищах з паливами. Для цієї мети пропонується, наприклад, висівати мікроорганізми на агар з моторним паливом або з фільтрувальним папером, що просочений паливом. В останньому випадку фільтри рекомендується поміщати на дно чашок Петрі. Іноді застосовують просочені паливом пластинки silicaгелю.

Однак істотним недоліком методу визначення кількості мікроорганізмів висівом на густі середовища є розподіл мікробних клітин як у водній фазі, так і в паливі, що не дозволяє приготувати точні суміші і провести кількісний посів.

Мікрофлору кожної фази приходиться враховувати окремо, тому даний метод придатний переважно для дослідження, але незручний для масових випробувань. Проте іноді він використовується для перевірки дії біоцидів у системах з паливами [4].

Виявлення й облік кількості життєздатних мікроорганізмів у нафтових фракціях і супутніх водах нерідко здійснюють за допомогою фільтрування визначеної кількості досліджуваної рідини через мембранні фільтри [2].

Фільтри після закінчення роботи рекомендується стерильно обробляти фізіологічним розчином, а якщо паливо з біоцидними присадками, то і розчином детергенту. Потім клітини, що залишилися на фільтрі, підрощують на агаризованих середовищах, розташовуючи фільтри в чашках Петрі і візуально підраховують кількість колоній, що вирости.

При підрахунку бактерій *Cladosporium resinae* рекомендується для зменшення їх зростання доводити значення рН до 3,5 або додавати розчин креозоту.

Для підрахунку бактерій фільтр розташовують, наприклад, на поверхні МПА, а іноді додатково заливають зверху тонким шаром середовища тієї самої сполуки з 2,3,5-трифенілтетразолієм хлористим (ТТХ).

Речовини, що редукуються бактеріями, відновлюють ТТХ, і середовище навколо колоній за-

барвлюється в червоний колір, що полегшує підрахунок бактерій.

Об'єм аналізованих проб визначається експериментально і може змінюватися від 1 мл для дуже забрудненого палива до декількох літрів, коли забрудненість невелика [3].

Для підрахунку кількості життєздатних мікроорганізмів у різних емульсіях, у т. ч. в сумішах нафтопродуктів з водою, рекомендують застосовувати експрес-метод з використанням скелець занурення.

Метод зручний тим, що немає необхідності досліджувати різні фази в сумішах або домагатися однорідності матеріалу, що в системах з паливами не завжди можливо. Крім того, він відрізняється швидкістю, достатньою легкістю виконання і дозволяє визначити кількість життєздатних форм в емульсії в межах від $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^5$ клітин в 1 мл. В основу цього методу полягає класичний метод скелець обростання, що застосовується для дослідження ґрунтових мікроорганізмів [5].

Використовуючи метод скелець занурення, стерильні предметні скельця покривають тонким шаром агаризованого поживного середовища, занурюють на визначений час у досліджувану емульсію, а потім переносять у чашки Петрі і витримують у термостаті протягом доби. Кількість мікроорганізмів визначають підрахунком кількості колоній на агарі з наступним перерахуванням на визначений об'єм за допомогою спеціальних кривих. Використання неоднакових середовищ дозволяє виявляти різні мікроорганізми.

Зростання мікроорганізмів за рахунок різних видів палива або індивідуальних вуглеводнів особливо часто оцінюють за масою сухої біомаси [6; 7]. Переважно цей метод використовують під час роботи з чистими культурами. При цьому біомасу відокремлюють від культуральної рідини різними способами.

Під час підрахунку бактерій і дріжджів найчастіше використовують фільтрування через мембранні фільтри під вакуумом. Цей метод застосовують при підрахунку мікробактерій і нокардій, що на відміну від багатьох інших бактерій розподіляються в культуральній рідині особливо нерівномірно, так що частина з них легко спливає разом з вуглеводнем [8].

Визначення біомаси міцеліальних грибів не становить особливих труднощів. Міцелій, вирощений у невеликому об'ємі середовища, зручно відокремлювати на мембранних фільтрах під вакуумом [9]. Коли міцеліальна маса велика, застосовують просте фільтрування через паперові фільтри відповідного розміру. Іноді міцелій гриба виділяють з культуральної рідини вигнутим

ніхромовим дротом, що взагалі виключає необхідність фільтрування. У цьому випадку біомасу переносять у підготовлений бюкс.

Відділену від культуральної рідини біомасу відмивають від солей розведеною соляною кислотою і дистильованою водою, а від вуглеводнів – хлороформом або петролейним ефіром. Остання операція веде до втрат біомаси, оскільки зазначені розчинники екстрагують деякі компоненти клітин.

Однак для підрахунку біомаси в лабораторних дослідженнях повне видалення з неї вуглеводнів не обов'язкове, особливо якщо біомасу відокремлювали від субстрату за допомогою фільтрів. Біомасу, зібрану на мембранних фільтрах, доводять до постійної ваги при температурі 70–80 °С.

Метод визначення сухої біомаси мікроорганізмів на середовищах з вуглеводнями за допомогою мембранних фільтрів одержав широке застосування. Однак він потребує великої витрати часу і для масових експрес-випробувань незручний.

Існує думка [2], що про наявність у паливі мікроорганізмів можна судити за кількістю в його складі мікробного білка. При використанні даного методу рекомендується відокремлювати біомасу від палива (наприклад, фільтруванням через мембранний фільтр), а потім суспендувати її в дистильованій воді, де і проводити визначення білка клітин.

Контроль за зростанням мікроорганізмів у водно-паливних системах можна здійснювати не тільки врахуванням кількості клітин або їх біомаси, але і спостереження за тими змінами, які вони викликають у середовищі.

Нерідко при активному зростанні мікроорганізмів показники якості субстрату змінюються мало, у той час як вміст мікроорганізмів у ряді випадків може завдати непоправної шкоди нафтопродукту.

Функції мікроорганізмів можна враховувати за споживанням компонентів середовища, за виділенням продуктів життєдіяльності, за зміною фізико-хімічних властивостей субстрату (у випадку палив – це в'язкість, змащувальні властивості, емульгування, кислотність тощо). Такий контроль припускає необхідність проведення спеціальних досліджень щодо виявлення мікрофлори, що вражає паливо, і вивченню її фізіолого-біохімічних ознак.

Окиснення вуглеводнів мікроорганізмами відбувається за участю кисню повітря. Тому одним з методів оцінки враження палив може бути підрахунок споживання кисню з середовища.

Швидкість мікробіологічного окиснювання нафти в перколяторній колонці, заповненій графітом, автори праці [3] урахували за споживанням кисню за допомогою автоматичного респіраатора, що працює в безперервному режимі.

Метод аналізу вуглеводнів нафти і нафтопродуктів дозволяє виявляти зміни, що відбуваються під дією мікроорганізмів у складі нафти, її фракцій, палив і т.д.

Метод припускає інкубацію визначеного виду мікроорганізму в мінеральному середовищі з нафтопродуктами (0,1 % об'єму) і наступну екстракцію вуглеводнів і продуктів їх деградації.

Отриманий екстракт піддають хроматографічному поділові на колонках з різними наповнювачами і розчинниками. Застосування газорідної хроматографії і мас-спектрометрії дозволяє визначити склад отриманих фракцій, чітко охарактеризувати активність мікроорганізмів, що окиснюють вуглеводні. Але через складність цей метод не може бути використаний при масових дослідженнях.

Багато мікроорганізмів виділяють у середовище відновники, що легко виявити відповідними індикаторами.

За ступенем зміни кольору індикатора можна судити про вміст бактерій у субстраті. Так, для швидкого контролю за кількістю бактерій у маслах і паливах можна використати ТТХ, який у присутності відновника перетворюється в нерозчинний червоний пігмент формазан [3]. У середовище з ТТХ додається певна кількість нафтопродукту, протягом 10–12 год інкубується при температурі 30 °С і через порівняння інтенсивності забарвлення дослідних проб з контрольними визначається концентрація бактерій.

Методи визначення вмісту бактерій у субстраті за допомогою ТТХ належать до експрес-методів.

Результати реєструються вже через кілька годин після змішування реагентів.

Однак деякі мікроорганізми зовсім не виділяють відновників або виділяють їх у дуже незначних кількостях.

Крім того, на відновлення індикаторів можуть впливати компоненти досліджуваного субстрату, внаслідок чого швидкість відновлення індикатора не завжди відповідає дійсній кількості бактерій у середовищі. Тому оцінка зростання бактерій цим методом є напівякісною.

Японськими вченими [10] було розроблено спосіб виявлення мікроорганізмів, сутність якого полягає у тому, що упаковка речовини, в якій можуть бути мікроорганізми, повинна складатися з прошарку матеріалу, який є непроникним для мікроорганізмів, але проникним для повітря, і матеріалу, непроникного для повітря.

Потім матеріал, непроникний для повітря, прошаркової частини упаковки віддирають, залишаючи упаковку непроникною для мікроорганізмів, але проникною для повітря. Далі упаковку витримують в умовах, які сприяють розмноженню мікроорганізмів, і встановлюють наявність чи відсутність розмноження.

Висновки

Виконаний аналіз літературних джерел, показав, що всі методи оцінки біологічного враження палив можна класифікувати за двома групами: довготривалі та експрес-методи.

Для визначення біологічного враження різних нафтопродуктів, проведення протимікробних заходів і в деяких інших випадках висока точність урахування мікроорганізмів, як правило, не потрібна.

Для зазначених ситуацій часто застосовують візуальний контроль за розвитком мікроорганізмів. Так, про зростання *Cladosporium resinae* у середовищах з авіаційним паливом свідчить обсяг і товщина міцеліальної плівки [3].

Вивчення існуючих методів оцінки біологічного враження показало, що домінуючими методами є довготривалі, основними недоліками яких є їх великі складність і трудомісткість.

На сьогодні до методів оцінки і прогнозування будь-яких параметрів або властивостей ставляться такі вимоги, як достовірність та відтворюваність, чутливість до зміни властивостей, точність, простота і універсальність [11]. Взагалі світова тенденція розвитку методів оцінки і прогнозування властивостей продуктів переробки нафти характеризується комплексним поєднанням перерахованих вимог разом зі значним зменшенням часу, необхідного на проведення аналізу. Тобто перспективними є експрес-методи.

Особливо важливим є експрес-визначення біологічного забруднення авіаційних палив, кондиційності яких пов'язана з безпекою польотів [12].

Оперативне визначення чистоти авіаційного палива як за показниками вмісту механічних домішок і води, так і за наявністю мікрофлори є важливим моментом у технології контролю якості авіаційних паливно-мастильних матеріалів під час проведення лабораторного (оперативного) і аеродромного аналізів. Для цього, на нашу думку, доцільним є розробка оперативної ефективної методики тестування авіаційних палив на біологічне враження.

З метою практичної реалізації розробленої методики необхідним є введення показника наявності мікрофлори до переліку показників, що характеризують якість авіаційного палива.

Список літератури

1. *Бойченко С.В.* Рациональное использование углеводородных топлив: Монография. – К.: НАУ, 2001. – 216 с.
2. *Литвиненко С.Н.* Защита нефтепродуктов от действия микроорганизмов. – М.: Химия, 1977. – 139 с.
3. *Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г., Мыльникова С.И.* Методы оценки поражаемости нефтяных топлив микроорганизмами // Биологические науки. – 1980. – № 2. – С. 15–25.
4. *Методика лабораторных испытаний антимицробной активности добавок к нефтяным топливам / И.Л. Работнова, Т.П. Вишнякова, Н.Н. Гречушкина и др.* // Биологические повреждения строительных и промышленных материалов. – 1973. – № 5. – С. 32–35.
5. *Красильников Н.А.* Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. – М.: Химия, 1966. – 142 с.
6. *Крейн С.Э., Бессмертный К.И., Нетте И.Т., Гречушкина Н.Н.* Изменение некоторых свойств нефтяных топлив под действием микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. – 1969. – № 2. – С. 235–237.
7. *Поражаемость* микроорганизмами нефтяных дистиллятных топлив и их защита / Н.С. Егоров, Т.П. Вишнякова, Н.Н. Гречушкина и др. // Биологические повреждения строительных и промышленных материалов. – К.: Наук. думка, 1978. – 267 с.
8. *Никитина К.А., Гречушкина Н.Н.* К методике учета количества микроорганизмов при развитии на средах с жидкими углеводородами // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология и почвоведение. – 1965. – № 5. – С. 23–27.
9. *Вишнякова Т.П.* Биологические поражения нефти и нефтепродуктов и их защита при транспортировании и хранении. – М.: Химия, –1977. – 52 с.
10. *Пат. 2719838 В2 3297397 А Япония.* Заключение о присутствии микроорганизмов / Sekiguchi Kazuya. – № 02102347; Заявл. 18.04.90; Изобретения стран мира. – 1999. – Вып. 46. – № 3. – 21 с.
11. *Абдуллаев А.А.* Контроль в процессах транспорта и хранения нефтепродуктов. – М.: Недра, – 1990. – 263 с.
12. *Козаченко А.И.* Контроль качества горючесмазочных материалов в гражданской авиации. – К.: КИИГА, 1992. – 244 с.

Стаття надійшла до редакції 01.09.04.

С.В. Бойченко, Н.Н. Кучма

Методы оценки биологического загрязнения нефтепродуктов

Приведены методы оценки биологического поражения топлив, которые можно классифицировать на две группы: продолжительные и экспресс-методы. Показано, что доминирующими методами оценки биологического поражения являются продолжительные, основные недостатки которых – сложность и трудоёмкость. Рассмотрены экспресс-определение биологического загрязнения авиационных топлив и методы выявления и предупреждения биологического загрязнения нефтепродуктов. Предложена оперативная эффективная методика тестирования авиационных топлив на биологическое поражение.

S.V. Boychenko, N.M. Kuchma

Evaluation methods of mineral oil biological pollution

The review of the literature has shown, that all mineral oil evaluation methods can be classified on two groups: long-term and express-method. the research of existing mineral oil biological pollution has permitted to formulate a conclusion that by dominant methods is long-term, which basic lacks are their large complexity and labouriousness. important there is express-evaluation of aviation fuel biological pollution. advisable there is elaboration of an operative effective procedure of aviation fuel biological test. with the purpose of practical realization of the developed technique necessary there is an introduction of quality coefficient «presence microflora» to the list of parameters, that characterize quality aviation fuel.